綬草之種苗量化

陳季呈[1]、余德發[1]、王啟正[1]、陳任芳[1]

摘要

綬草為具觀賞與藥用的蘭科植物，由於人為採集目前已不常見，為了大量繁殖綬草的種苗，進行組織培養及菌根菌輔助綬草繁殖技術研發，結果顯示以授粉後 20 天成熟度果莢播種發芽率較佳，以 1/2 或 1/4MS 培養基添加 MES 及 peptone 可提高種子發芽率。實生苗培植體在特定基鹽與蔗糖濃度的培養下，存活率可高達 70.8%且生育良好，無褐化及玻璃質化現象發生。細胞分裂素與椰子水處理均可誘導培植體產生芽體，最高可獲得 7 個不定芽形成，過高濃度的細胞分裂素處理，培植體葉片易發生肥大扭曲且出現白化現象。組培苗經不同馴化處理方式其存活率可達 85%以上。在菌根菌輔助綬草繁殖技術方面，以菌根菌先接種於培養基上， 7 天後播種其上綬草種子之發芽率 73.2%最高，播種密度以 0.2 $g \cdot m^{-2}$ 的種子用量表現最佳，栽培介質以溪砂加牛糞可使栽培之綬草收成達最高之鮮重。上述建立之技術，以非專屬授權方式技轉業者使用，生產綬草種苗。

前言

綬草(*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames)為台灣原生蘭，清明時粉紅色花朵沿著花莖盤繞開放，故稱青龍抱柱、清明草，又其根如人參狀，又稱盤龍參(余及陳，2001；林，1988；Su, 2000)。植物分類為蘭科綬草屬，植株迷你，根莖短、根系肥厚、簇生；葉呈線形至線狀披針形叢生於基部；花小，呈白至粉紅色，花徑約 0.6 至 0.8 cm，穗狀花序。綬草分布廣闊，在台灣全島的平地、低海拔向陽草地、濕潤地草叢中均可見(林，1988；Su, 2000)。因其花朵小巧雅緻，在園藝利用可栽培為袖珍盆景；保健方面，綬草根和全草可入藥，有益氣養陽、清熱解毒之效；現代藥理研究指出其具抗癌功效(李，2005)；亦可將全株浸泡米酒或熬鷄湯作為食補之用(余及陳，2001)。

關鍵字：綬草、組織培養、菌根菌、量產
Index words: *Spiranthes sinensis*, tissue culture, mycorrhizal fungi, mass production.

1. 行政院農業委員會花蓮區農業改良場副研究員、副研究員、助理研究員、副研究員。Associate Researcher, Associate Researcher, Assistant Researcher, Associate Researcher, Hualien District Agricultural Research and Extension Station, Hualien, Taiwan.

由於綬草外觀與雜草相似，在非開花期，不易辨識，經常被當成雜草除去，當其花開時又引人們採集，造成野生族群已瀕臨絕種。為避免綬草因人為過度採集而滅絕，行政院農業委員會花蓮區農業改良場開發其組培及利用菌根菌來生產綬草種苗技術，技轉業者使用，以量產種苗，供應人們需求。

一、開發組織培養促進綬草種子發芽關鍵技術

綬草因不具完整種子之構造，故在自然環境下發芽率不高，影響其無菌播種之種子發芽率包括果莢成熟度、光照強度及培養基配方等。劉等(2001)認為以授粉後 14-18 天的成熟果莢播種有休眠現象，待 1-1.5 個月後種子才發芽，發芽率低於 5%且發芽不整齊，以 10-12 天果莢播種，3-4 週發芽，發芽率為 70-80%，4-6 週有葉片長出。張等(2003)以授粉後 15-20 天之果莢播種，1 個月後形成原球體，3-4 個月形成小苗。光照方面，Oliva 及 Arditti(1984)以綬草屬 S. gracilis 與 S. romanzoffiana 進行無菌播種，研究指出 S. gracilis 需在照光下培養種子才會發芽，而 S. romanzoffiana 則需在黑暗下培養；劉等(2001)及張等(2003)無菌播種之光照環境皆為 1000 lux，而 Tanaka 等(1997)則為 500 lux。培養基方面，由於發芽培養基主要為礦物鹽類、維生素、糖類及洋菜所構成，可提供種子發芽所需，劉等(2001)及張等(2003)試驗綬草的發芽培養基配方各不相同，報告中並無比較，亦無推薦最適合的培養基配方。

(一)培養基成分對綬草種子發芽率之影響

試驗以 MS(Murashige and Skoog, 1962)、1/2MS、1/4MS、1/2MSMP(1/2MS，MES 1g/l，peptone 2g/l)及 WORS(資料未發表)等 5 種培養基配方，播種授粉 22-24 天果莢，經 30 天後調查其發芽率與觀察褐化程度。 結果顯示綬草播種後 30 天平均發芽率以 WORS 培養基最高為 58%(表 1)。綬草成熟胚在發芽培養基上會先形成擬原球體，而且此擬原球體會自行增生(圖 1A)，增生約 2 至 4 週後才慢慢長出地上部之芽體(圖 1B)。

由於蘭科種子發芽所需之氮量不高，MS 培養基對許多蘭花而言，含氮量過高容易造成肥害。比較 MS、1/2MS 及 1/4MS 處理，結果顯示以 1/2MS 培養基之發芽率 49%最高，1/4MS 處理次之，MS 處理最低。雖然 1/4MS 氮含量更低，且為多個蝴蝶蘭品種發芽適合之培養基，但考量微量元素、鐵鹽及維生素等亦僅為 MS 之四分之一，似乎比較缺乏，故綬草播種培養基仍以 1/2MS 較佳，未來可考慮以 1/2 或 1/4MS 巨量元素及 MS 全量微量元素、維生素的培養基作為發芽培養基。

植物分泌酚類化合物為培養基酸化之主因，而蘭科植物較易分泌酚類化合物，因此蘭花在進行組織培養時經常使用 pH 值緩衝劑(如 MES)來防止 pH 值強烈變化。另外，蘭科植物進行組織培養時，經常添加有機化合物(如 peptone)，可作為培養基氮不足之緩慢補給。本試驗 1/2MSMP 及 WORS 培養基均添加 MES 及 peptone，可減少因酚類化合物及有機酸而造成 pH 值的變化，這應是培養基褐化程度低(表 1)的主因。

表 1. 播種培養基對綬草未成熟胚發芽率之影響

Table 1. Effect of germination medium on the embryo germination rate [z] of *Spiranthes sinensis*.

Medium	Ratio of embryo germination (%)	Browning degree
MS	38±8.7	+++
1/2MS	49±7.4	++
1/4MS	44±9.5	+
1/2MSMP	55±9.1	—
WORS	58±10.1	—

[z] Data were measured 30 days after treatments.

(二)不同果莢成熟度對發芽之影響：

綬草果莢約於授粉 25 天後開裂，本試驗以授粉 10-15、16-20、21-25 天三種成熟度果莢進行無菌播種，結果顯示以 16-20 天成熟度果莢其發芽率最高(表 2)，劉等(2001)指出以授粉 14-18 天成熟果莢播種會有休眠現象，需經過 1-1.5 個月才見到種子發芽，發芽率低於 5%且不整齊，而以授粉 10-12 天果莢播種 3-4 週即可見發芽，發芽率為 70-80%間，4-6 週即有葉片長出；而張等(2003)以授粉 15-20 天果莢播種 1 個月後種子發育成原球體，推測應是品種不同而造成之差異。本試驗結果與張等(2003)相似，以中等成熟度之果莢播種發芽率較高，且授粉 10-15 天果莢播種之發芽率甚至比成熟果莢(21-25 天)為高(表 2)。

表 2. 蒴果成熟度對綬草未成熟胚發芽率之影響

Table 2. Effect of the capsules ages on the embryo germination rate [z] of *Spiranthes sinensis*

Capsules ages (Days after pollination)	Ratio of embryo germination (%)
10-15	21±8.3
16-20	55±9.1
21-25	42±7.8
26-30	--

[z] Data were measured 30 days after treatments.

二、開發綬草繼代培養關鍵技術

由於蘭科植物在自然環境下有繁殖不易且繁殖速率緩慢等問題，再加上國人於野外大量地採集，使得綬草族群越來越少，因此開發組織培養技術來繁殖種苗有其必要。目前已成功以無菌播種(劉等，2001；張等，2003；Oliva and Arditti，1984)方式獲得原球體再長成幼苗，或誘導原球體形成不定芽，達到增殖之目的。

因相關研究不多，因此花蓮農改場投入綬草組織培養技術之研究，期能解決上述問題，達到量產種苗之目的。

(一)基鹽及蔗糖濃度對綬草繼代培養之影響

以實生瓶苗為試驗材料，探討適宜綬草生育之基鹽、蔗糖、植物生長調節劑等培養基組成分。基鹽濃度試驗，結果顯示 T2 處理培植體存活率 70.8%為最高，T3 處理次之，T1 處理最低僅 24.3%(表 3)。另上述 3 個處理培植體皆有根生成，株高、根數及根長以 T2、T3 處理表現較 T1 好且差異顯著(表 3)。觀察培植體外觀，T1 處理培植體外觀粗短，鮮重 0.46 g 最高，與其他處理差異顯著(表 3)。

於 T2 基鹽濃度條件下，以 S1-S6 之蔗糖濃度處理綬草培植體，結果顯示培植體在 S1 至 S6 處理皆有根生成，根數為 2.4 至 3.2 根，其中 S6 處理根長 0.6 cm 較其他處理短且差異顯著(表 4)。培植體鮮重隨著蔗糖濃度提高有增加之趨勢，以 S1 處理鮮重 0.24 g 最低，S6 處理鮮重 0.32 g 最高。培植體株高以 S2 處理 5.1 cm 最高，隨著蔗糖濃度提高而株高隨之降低，以 S6 處理培植體 3.2 cm 最矮(表 4)，故高蔗糖濃度處理，培植體地上部與地下部外觀較為粗短，低濃度蔗糖處理則較為細長。因此，綬草培植體以 T2 基鹽搭配 S3 蔗糖濃度培養最為適宜，培植體生育良好，且可正常發根展葉。

表 3. 基鹽濃度對綬草生育之影響

Table 3. Effect of salt-base strength on explant growth[z] of *Spiranthes sinensis.*

salt-base strength	Survival rate (%)	Fresh weight /explant (g)	Plant height (cm)	No. of roots /explants	Root length /explant (cm)
T1	24.3b[y]	0.46a	3.0b	0.6b[b]	0.4b
T2	70.8a	0.37b	3.8a	1.5a	1.4a
T3	60.1a	0.33b	3.8a	1.4a	1.4a

[z] Data were measured 6 weeks after treatments.

[y]Means separation within columns by LSD at 5% level.

表 4. 蔗糖濃度對綬草生育之影響

Table 4. Effect of sucrose concentrations on explant growth[z] of *Spiranthes sinensis.*

Sucrose	Fresh weight /explant (g)	Plant height /explant (cm)	No. of roots /explant	Root length /explant (cm)	No. of leaves /explant
S1	0.24b[y]	4.6a	3.1a	1.1a	4.9b
S2	0.27ab	5.1a	3.2a	1.2a	5.4ab
S3	0.31a	4.7a	2.4a	1.0a	6.1a
S4	0.30a	4.5a	2.8a	1.2a	6.2a
S5	0.30a	4.1a	2.8a	1.0a	6.2a

S6	0.32a	3.2b	2.7a	0.6b	6.1a

z Data were measured 8 weeks after treatments.

yMeans separation within columns by LSD at 5% level.

(二)植物生長調節劑組合處理對綬草芽體增殖之影響

試驗以植物生長調節劑組合處理 T1-T12 探討對綬草芽體增殖之影響，結果顯示培植體培養於不含細胞分裂素之處理(T1、T5、T9)，基部有根與不定芽形成，且隨著細胞分裂素處理提高，培植體形成不定芽數亦隨之增加，但過高的細胞分裂素處理(T4、T8、T12)其不定芽生成數反之降低(表 5)，且培植體部分葉片發生肥大扭曲且出現白化現象。試驗以 T7 處理可獲得 7.0 個不定芽表現最好(表 5、圖 2A,B)。另觀察培植體基部有芽球生成，隨著細胞分裂素處理濃度提高，誘導芽球數亦隨之增加，以 T8 及 T12 處理最高與其他處理差異顯著(表 5)，將芽球繼代於不含植物生長調節劑之培養基持續培養後，芽球則易長成葉片肥大扭曲的芽體或發生白化現象，為生長異常芽體。添加 auxin 可誘導根形成，以 T9 處理之根數為 9.6 枝最高，T5 處理 7.4 枝次之(表 5)。

比較細胞分裂素 BA 與 Kinetin，調查結果顯示 BA 處理可獲得較多的不定芽生成，顯示 BA 之處理效果較 Kinetin 佳。綬草培植體於 BA 處理下基部有芽球生成，Kinetin 處理則無。添加椰子水亦有促進芽體生成之效果。凝膠物質則以 gelrite 較 agar 為佳。將培養獲得之不定芽切下，繼代於不含植物生長調節劑之 T2 基鹽搭配 S3 蔗糖濃度培養下，芽體會抽長並且發根展葉成完整植株(圖 2C)，惟培養約 1 個月後，培植體葉片有黃化情形。組培苗馴化方面，試驗結果顯示綬草組培苗為生命力旺盛之種苗，在馴化期間，其馴化環境對高溫的耐受力強，組培苗經不同馴化處理方式其存活率可達 85%以上，其中不經瓶內馴化及經瓶內馴化 1 週之處理，其存活率均為 100%，且組培苗生育情形良好，於溫室栽培 3 至 4 個月部分植株即有花芽萌出(圖 2D,E)。

三、開發利用菌根菌大量繁殖綬草關鍵技術

(一)菌根菌之最適生長溫定

將供試菌株切取菌絲尖端在 PDA 平板上培養 7 天，在菌落邊緣以打孔器切取菌落周圍直徑 8 mm 之菌絲塊圓盤，植至新鮮之 PDA 平板上，分別置於 20、23、26、29、32 及 35℃定溫箱中培養，第 10 天記錄其菌絲生長長度。結果顯示菌根菌之菌絲生長長度在 20℃處理僅 3.2 cm，隨生長溫定上升，菌根菌之菌絲生長長度越長，以 32℃處理菌絲生長長度 8.3 cm 最長最長，29℃處理次之為 8.0 cm，當溫度到 35℃時其生長有趨緩之趨勢(表 6)。

表 5. 植物生長調節劑組合處理對綬草不定芽增殖之影響

Table 5. Effect of plant growth regulators combined treatments on shoots formation[z] of *Spiranthes sinensis.*

Treatments	No. of shoots /explant	No. of shoot buds /explant	No. of roots /explants
T1	3.6cd[y]	0e	5.5d
T2	6.0ab	1.1e	3.0fg
T3	6.0ab	2.4de	1.9gh
T4	5.3bc	4.4bc	3.3fg
T5	3.3d	0e	7.4b
T6	5.8b	3.4cd	2.3gh
T7	7.0a	5.4b	2.1gh
T8	4.3cd	7.5a	1.6h
T9	4.0cd	0e	9.6a
T10	5.4bc	3.0cd	1.6h
T11	6.5ab	3.4cd	2.5gh
T12	3.6cd	7.4a	1.4h

[z] Data were measured 8 weeks after treatments.

[y]Means separation within columns by LSD at 5% level.

表 6. 溫度對共生菌根菌菌絲生長之影響

Table 6. Effect of temperature on hyphae growth[z] of mycorrhizal fungi.

Temperture (℃)	Diameter (cm)										Average (cm)
35	7.6	7.2	7.4	7.6	7.5	6.8	7.1	7.2	7.1	7.2	7.3
32	8.4	8.2	8.2	8.5	8.5	8.3	8.3	8.5	8.2	8.3	8.3
29	7.7	8.3	8.5	8.1	8.5	6.8	8.2	7.2	8.5	8.0	8.0
26	5.9	6.0	5.7	6.0	5.7	5.8	5.9	6.2	6.0	5.9	5.9
23	5.3	4.4	5.6	5.6	4.5	5.8	4.6	5.2	5.8	6.0	5.3
20	3.5	3.4	3.3	3.3	2.9	3.5	3.4	3.2	2.7	2.4	3.2

[z] Data were measured 10 days after treatments.

(二)菌根菌對綬草種子發芽之影響試驗

取綬草果莢表面消毒後，將之切開直播種子於水瓊脂上，並接種菌根菌，觀察菌根菌對綬草種子發芽及發芽後之生長情形。14 天後調查其發芽數，之後每週調查一次。結果顯示以將菌根菌先接種於培養基上，7 天後播種綬草種子之發芽率 73.2%最高，其次為綬草種子播種 7 天後再接種菌根菌之發芽率 68.4%，

接種菌根菌 14 天後再播種綬草種子之發芽率 54.0%，播種同時接種菌根菌之發芽率 47.5%較差，不接種菌根菌之綬草種子完全不發芽；試驗結果顯示將菌根菌先接種於培養基上，7 天後再播種綬草種子最適合其發芽(表 7)。

表 7. 菌根菌接種時間對綬草種子發芽的影響

Table 7. Effect of mycorrhizal fungi inoculated time on the germination rate of seeds of *Spiranthes sinensis.*

Inoculated date	Sawed date	Ratio of germination (%)										Average
4/27	4/27	57.0	46.6	54.1	47.5	42.1	41.3	57.0	38.5	37.9	53.3	47.5
4/27	5/4	82.7	71.2	83.9	74.6	65.1	81.6	64.6	71.6	56.7	79.6	73.2
4/27	5/11	97.5	31.1	34.2	78.2	92.6	54.9	55.8	38.8	25.7	31.0	54.0
5/4	4/27	67.3	56.7	50.9	56.3	78.7	80.8	73.2	45.6	87.0	87.5	68.4
CK	4/27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(三)利用菌根菌協助綬草量產關鍵技術研發

將菌根菌先接種於裝有溪沙的育苗盤內，7 天後以 0.2、0.6 及 1.0 $g \cdot m^{-2}$ 三種種子用量進行播種量試驗，調查結果顯示綬草種子用量隨種子用量提高之單位面積綬草鮮重、乾重、鮮乾重比及株數有降低之趨勢，以 0.2 $g \cdot m^{-2}$ 種子用量之鮮重、乾重、鮮乾重比及株數較高，以 1.0 $g \cdot m^{-2}$ 種子用量較低，結果顯示綬草種子用量以 0.2 $g \cdot m^{-2}$ 較佳(表 8)。

表 8. 綬草播種量對採收量之影響

Table 8. Effect of sawing rate on plant harvest of *Spiranthes sinensis.*

Sawing rate ($g \cdot m^{-2}$)	Fresh weight/ m^2 (g)	Dry weight/ m^2 (g)	Ration of fresh and dry weight (%)	No. of plants/m^2
1.0	216.23	29.01	13.42	730
0.6	336.05	53.52	15.93	894
0.2	883.68	144.05	16.30	2575

四、綬草栽培介質試驗

為探討不同栽培介質對於綬草之生育影響，分別以壤土加牛糞(19:1)、溪沙加牛糞(19:1)、栽培土(滿地王 3 號)、栽培土加溪沙(2:1)、栽培土混合真珠石(4:1)等五種栽培介質，種子來源以同一植株在隔離區讓其自然授粉，採收同一花穗成熟蒴果。育苗以溪沙為育苗栽培介質並接種菌根菌，再撒播綬草種子。待幼苗 2-3 葉，根長約 1- 2 公分時再移植到長花槽每盆 20 株進行栽培介質試驗。

結果顯示綬草根鮮重、地上部鮮重、單株鮮及乾重等均以溪砂加牛糞為栽培介質最重，其次為栽培土加真珠石，再其次為栽培土；以壤土及栽培土加溪沙栽培介質種植綬草較差；綜合試驗結果以溪砂加牛糞為栽培介質種植綬草之生育表現最好(表 9)。

表 9. 栽培介質對綬草生長之影響

Table 9. Effect of medium on growth of *Spiranthes sinensis.*

Media	Root fresh weight/plant (g)	Shoot fresh weight/plant (g)	Fresh weight /plant (g)	Dry weight /plant (g)	Ration of fresh and dry weight (%)
Loam	1.25	1.25	2.47	0.51	20.38
Sand	2.33	1.76	4.09	1.01	24.56
Cultural media	1.72	1.30	3.02	0.63	21.46
Cultural media+ sand	1.39	1.08	2.46	0.39	15.56
Cultural media+ perlite	1.87	1.65	3.57	0.70	19.12

五、綬草量產繁殖技術授權及商品化

本場於 93、97 及 103 年先後研發之綬草量產繁殖技術，分別以「綬草種苗組織培養技術」、「綬草繁殖栽培技術」及「綬草組織培養苗大量繁殖技術」，以非專屬授權方式技術轉移業者，來量產綬草種苗。「綬草種苗組織培養技術」即開發無菌播種及不定芽繁殖技術。「綬草繁殖栽培技術」即利用菌根菌協助綬草種子發芽，透過適宜之栽培技術達到量產目的。「綬草組織培養苗大量繁殖技術」則開發其微體繁殖體系，解決種子發芽率低及繁殖速率緩慢等問題，建立其種苗快速繁殖體系。另因自然環境下，綬草於春季 3 至 4 月花期過後其地上部會逐漸乾枯進入休眠期，待 9 月時再重新長出新葉，故在此期間無法生產綬草種苗，利用組織培養技術來繁殖種苗則不受此限制，全年皆可繁殖並供應種苗，達到終年生產之目的，提高農民之收益。

結論

綬草因人們無情的採集，目前已不常見，唯有利用人工大量繁殖才能獲得大量品質均一之綬草植株產品，並可間接減少人們的採集，本場利用組織培養技術及菌根菌技術來大量繁殖綬草種苗，其中包含了無菌播種技術、組織培養大量增生分生苗技術、組織培養出瓶技術以及菌根菌培養及輔助綬草發芽技術、介質栽培綬草技術等。這些技術確實可以大量繁殖綬草種苗，相信對這種以前在台灣東部草地上處處可見的藥用蘭科植物之復育與繁殖有所助益。

參考文獻

1. 王啟正. 2004. 兼具觀賞及藥用綬草之組織培養技術. 花蓮區農業專訊. 49:17-19.
2. 余德發、陳任芳. 2001. 小巧玲瓏的原生植物－綬草. 花蓮區農業專訊. 36:8-10.
3. 李文麗. 2005. 盤龍參抗 S180 肉瘤的實驗觀察. 數理醫藥學雜誌. 18:255.
4. 林讚標. 1988. 綬草. 台灣蘭科植物第一卷. 南天書局. 台北. p. 244-245.
5. 張正、陳盈君、嚴新富. 2003. 綬草無菌播種與生長發育. 中國園藝. 49:407-410.
6. 陳季呈. 2010. 可供觀賞又保健的清明草之組織培養技術開發. 花蓮區農業專訊. 49:5-7.
7. 劉祖惠、許乃文、嚴家瑜、吳瑞玉. 2001. 利用不定芽再生進行綬草微體繁殖. 中國園藝. 47:51-58.
8. Masuhara, G. Katsuya, K. Yamaguchi, K. 1993. Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seed of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* in vitro. Mycological Research 97(6): 746-752.
9. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
10. Oliva, A. P. and J. Arditti. 1984 Seed germination of northern American orchids. II. Native California and related of *Aplectrum, Cypripedium* and *Spiranthes*. Bot. Gaz. 145(4):495-501.
11. Su, H I. 2000 *Spiranthes* L. C. Rich. In:Huang. T. C. (eds). Flora of Taiwan V5. Editorial Committee of Flora of Taiwan, Department of Botany. National Taiwan University. Taipei. p.1034.
12. Tanaka, K., K. Kondo, and K. Sato. 1997. Micropropagation of Spiranthes sinesis(Pers.) Ames(Orchidaceae) In:Bajaj, Y. P. S.(ed.) Biotechnology in agriculture and forestry. Vol.40. p.289-295. Spring-Verlag. Berlin Heidelberg.
13. Tsutsui, K. Tomita, M. 1986. Symbiotic germination of *Spiranthes sinensis* Ames associated with some orchid endophytes. Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University 62(4): 440-452.
14. Tsutsui, K. Tomita, M. 1989. Effect of plant density on the groth of seedlings of *Spiranthes* sinensis Ames and *Liparis nervosa* Lindl. in symbiotic culture. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 57(4): 668-673.
15. Uetake, Y. and Peterson, R. L. 1998. Association between microtubules and symbiotic fungal hyphae in protocorm cell of the orchid species, *Spiranthes sinensis*. New Phytol. 140: 715-722.

Mass production of *Spiranthes sinensis* Seedlings

Chi-Cheng Chen[1], Der-Fa Yu[1], Chii-Jeng Wang[1], Jen-Fang Chen[1]

Abstract

Spiranthes sinensis is an orchid with ornamental and medicinal functions. Because people collected a lot, it has rarely seen. We established the tissue culture propagation system and used mycorrhizal fungi to increase seed germination to mass production seedlings of *Spiranthes sinensis*. The results showed that 20 days after pollination, the seed germination rate was higher than other treatments. Using 1/2 or 1/4MS with MES and peptone medium could increase seed germination. The explants of *Spiranthes sinensis* were grown well in fit salt-base strength and sucrose concentration, the survival rate of explants could be as high as 70.8%, and there were no browning and vitrification. Cytokinin and coconut milk could induce shoot formation. Using fit plant growth regulator combined treatment could induce 7.0 shoots formation and there were shoot buds formed in the base of explants. With high cytokinin concentration treatment, the leaves of explants would become curved or whiteness. The survival rate of plantlets could up to 85% in all acclimation treatments. The results showed that mycorrhizal fungi were inoculated in the media after 7 days then sowed seeds in the media, the germination rate 73.2% was higher than other treatments. The best sowing density treatment and cultural media were 0.2 $g{\cdot}m^{-2}$ and sand mixed with cattle mature media, respectively. Above-mentioned propagated techniques of *Spiranthes sinensis* were transferred to industry to mass production seedlings

1. Associate Researcher, Associate Researcher, Assistant Researcher, Associate Researcher, Hualien District Agricultural Research and Extension Station, Hualien, Taiwan.

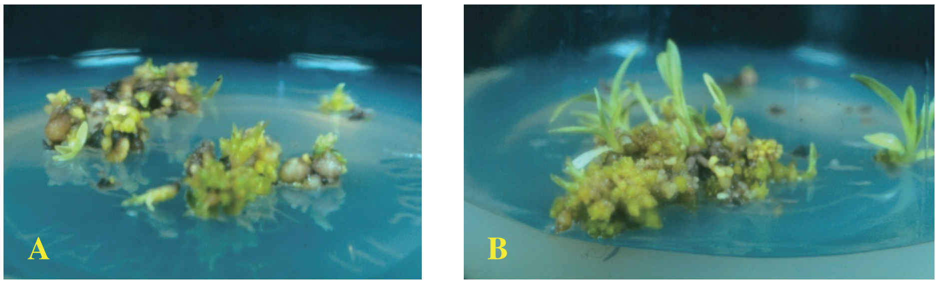

圖 1. 綬草未成熟胚於培養基發芽之情形。

Fig. 1 Germination of *Spiranthes sinensis* on the medium.

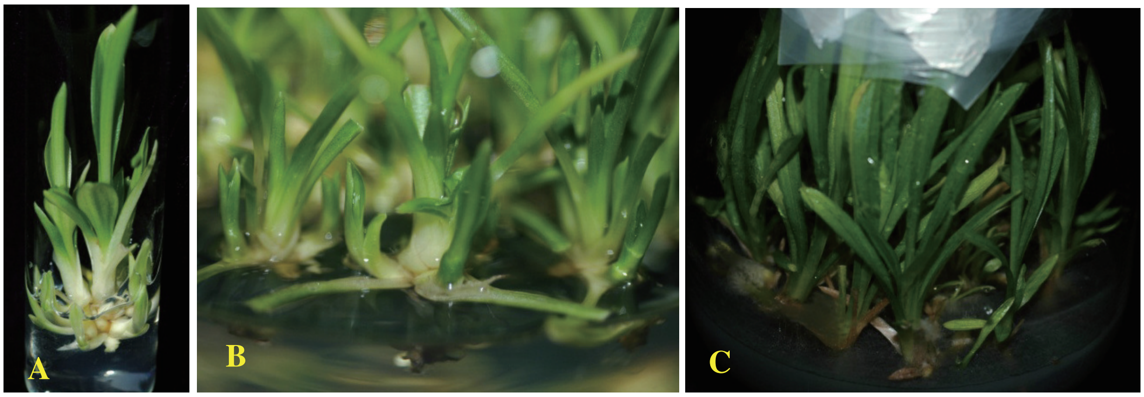

圖 2. 綬草組織培養繁殖流程。

A. 及 B. 芽體增殖。C. 芽體抽長，發根展葉成組培苗。D. 及 E. 組培苗馴化及栽培 3-4 個月後之生育情形。

Fig. 2 The tissue culture processes of *Spiranthes sinensis*.

A. and B. Shoots propagation. C. Shoot elongation and developing into plantlets. D and E. Growth condition of plantlets after planted 3-4 months.